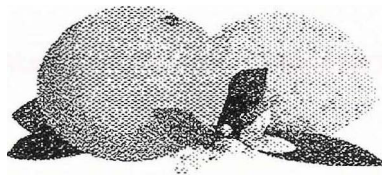


RAPPORT DE MISSION

L'INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (I.V.I.A.)

MONCADA-VALENCIA, ESPAGNE

du 2 au 6 novembre 1992



Régis Domergue

Remerciements:

Je tiens à remercier très sincèrement Mr Navarro, chef du laboratoire de culture de tissus de l'IVIA, d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire pour y étudier la technique du microgreffage des agrumes, technique dont il est l'initiateur.

Mr José Juarez m'a enseigné la technique et n'a cessé de me prodiguer de précieux conseils, je lui exprime ici ma sincère reconnaissance.

Malgré la courte durée de ce stage, j'ai pu apprécier l'accueil chaleureux de l'équipe du laboratoire de culture *in vitro* de l'IVIA, que chacun de ces membres en soit remercié.

SOMMAIRE

I - L'emploi du temps.

II - La technique de microgreffage.

III - Utilisation pratique de la technique et schéma directeur.

I- L'emploi du temps.

2 novembre 1992

- Trajet Montpellier-Valencia.
- Arrivée à l'Hotel LONDRES.

3 novembre 1992

- Arrivée à l'IVIA.
- Rencontre de Mr Juarez qui m'encadrera pendant la durée du stage.
- Visite du laboratoire.
- Apprentissage de la technique.

4 novembre 1992

- Suite de l'apprentissage.
- Visite des serres de l'IVIA.

5 novembre 1992

- Microgreffage en conditions réelles sur du matériel IRFA.

6 novembre 1992

- Rencontre et discussion avec Mr Navarro.
- Photos des installations et du microgreffage en phase "serre".
- Retour Valencia-Montpellier.

II - La technique

But : Régénérer des variétés d'agrumes infectés par un virus.

La technique en deux mots:

Prélèvement du méristème "greffon" (+ 2, 3 primordium) sur la plante à régénérer et mise en place dans une incision pratiquée sur une plantule élevée *in vitro* "porte-greffe".

Le porte greffe

Les porte-greffe sont issus de semis *in vitro*. L'expérience de l'IVIA montre que des semis de 15 jours environ donnent les meilleurs résultats. Le porte greffe utilisé lors de mon stage est le Citrange Troyer.

Une fois l'explant sorti de son tube (en conditions stériles), celui ci est "décapité" environ 2 cms au dessus du collet. De même les cotylédons et les bourgeons présents à leur base seront sectionnés. La racine pivotante sera également réduite à 4 cms en dessus du collet. (Photo n°1)

Sur l'explant ainsi préparé, il est pratiqué, sous la loupe binoculaire, une incision en forme de T renversé, en prenant bien soin de ne pas blesser le cambium. En effet, cette blessure provoquerait la formation d'un cal qui "étoufferait" le méristème et empêcherait son développement. Mr Juarez possède à ce sujet une belle série de photos de coupes histologiques.

Lorsque l'incision est faite, le porte-greffe est placé en attente sous la hotte.

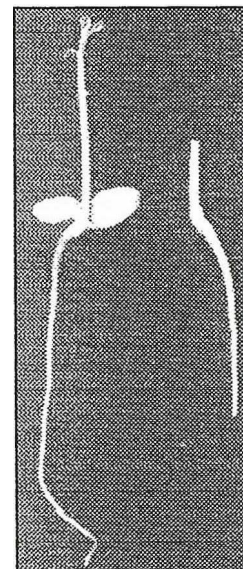


Photo n°1:
Plantule *in vitro*
utilisée comme
porte-greffe
(D'après Navarro,
1992)

Un bon contact greffon/porte-greffe est un gage de réussite de la greffe. La schéma n° 3 représente les différentes possibilités expérimentées par Navarro. La position "e" ayant été retenue.

L'explant comprenant à présent porte-greffe plus greffon est placé en tube sur milieu liquide (MS + saccharose), un pont de papier filtre permettant sa tenue en position verticale. Le milieu liquide a été choisi d'une part pour faciliter la mise en place de l'explant et d'autre part pour éviter la formation de racines latérales.

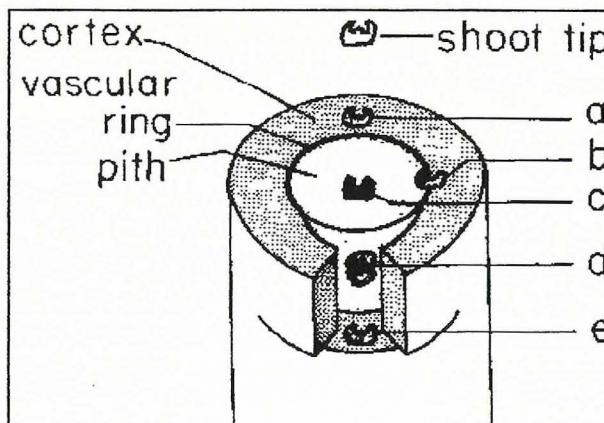


Schéma n°3: Différentes possibilités de positionnement du méristème (D'après Navarro, 1992)



Photo n°4: Microgreffe âgée d'environ 2 semaines (photo Nicoli)

Au bout d'une semaine, une observation sous la loupe, permettra de contrôler la reprise du méristème. Le taux de reprise moyen est de 40%. La photo n°4 représente une microgreffe âgée d'environ 2 semaines.

Au terme d'un mois de culture, l'explant qui, à ce stade, a deux feuilles bien développées est apte à être transféré *in vivo*.

La technique la plus rapide de transfert *in vivo* consiste à pratiquer une seconde greffe sur un plant vigoureux cultivé en serre. (schéma n°5)

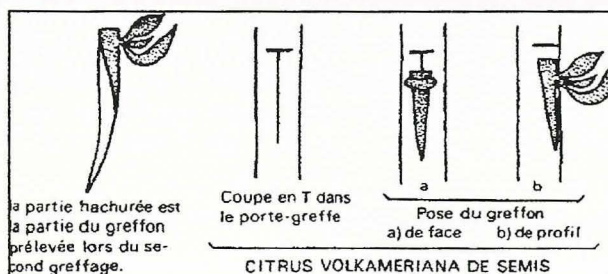


Schéma n°5: Technique du second greffage en serre (D'après Nicoli, 1985)

Le greffon

De jeunes pousses prélevées en serre serviront de greffons. Il faudra prévoir d'effeuiller la plante à régénérer quelques temps avant le microgreffage (environ 10 jours) pour favoriser le démarrage des bourgeons axillaires et ainsi provoquer la formation de jeunes rameaux.

Une fois les rameaux récoltés, ces derniers sont effeuillés à l'aide d'une pince fine et réduits à la taille d'un cm. L'ensemble des pousses ainsi réduites est placé dans une gaze et plongé pendant 5 mn dans du NaOCl à 0.25%

Après 5 rinçages rapides à l'eau stérile, les pousses sont placées à l'intérieur d'une boîte de Pétri en verre contenant un papier filtre Wattman n°50 humidifié.

C'est dans une boîte de Pétri équipée de la même manière qu'est pratiqué le prélèvement du méristème de chaque pousse. (changement de boîte tous les 3 explants).

A l'aide d'un scalpel, la pousse de 1 cm est réduite à la taille de 3 mm. Ensuite, sous la loupe binoculaire, toutes les feuilles et ébauches foliaires sont éliminées à l'aide d'une aiguille montée tenue de la main droite pendant que la main gauche maintient en place l'explant grâce à une pince fine non coupante.

Lorsque apparaissent les 2 ou 3 premiers primordium, recouvrant le méristème, intervient la lame de rasoir montée sur un porte-lame. Il s'agit de découper par la base le méristème et les primordium (environ 0.1 mm). C'est la phase la plus délicate de la technique.

Seule une grande pratique permet d'acquérir le geste adéquat sans hésitation ni tremblement. Lors de la découpe du méristème, celui-ci vient (théoriquement) se placer sur la lame. Il suffit ensuite de la déposer entre les lèvres, résultat de l'incision en T, sur le porte-greffe. Cette phase est aussi très délicate vu la taille du méristème (photo n°2)

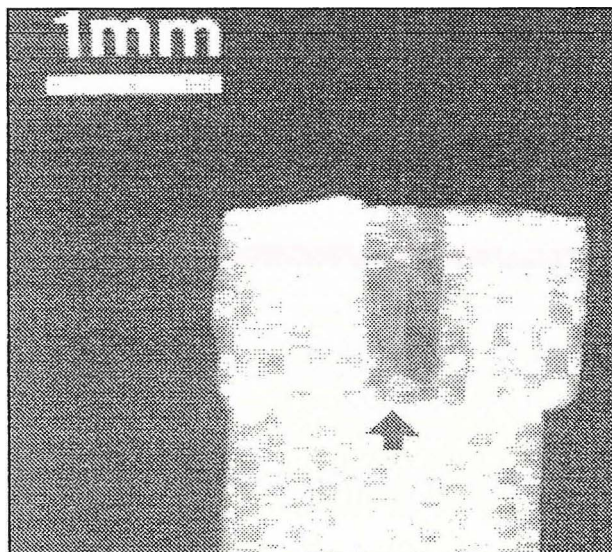


Photo n°2: Méristème mis en place sur le porte-greffe (D'après Navarro, 1992)

Une fois la greffe pratiquée et entourée de plastique, le porte-greffe est courbé de façon à réduire la dominance apicale de ce dernier et ainsi favoriser le flux de sève vers le greffon (photo n°6).

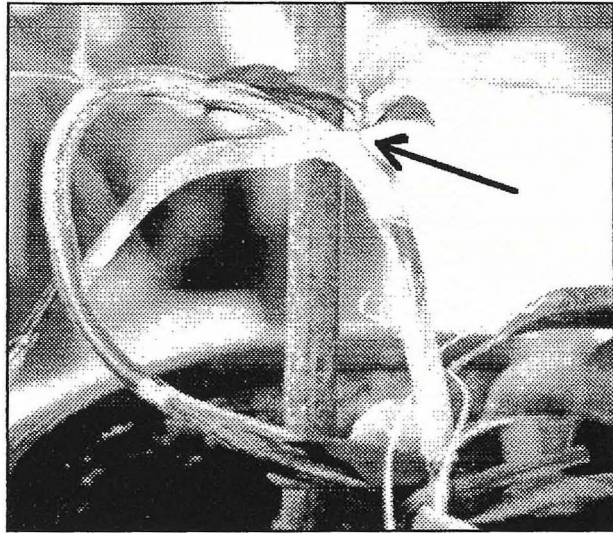


Photo n°6: Second greffage en serre. Notez la courbure du porte greffe.



Photo n°7: Plant greffé placé en serre chaude sous sac plastique.

Pour s'assurer d'une meilleure reprise, le plant greffé est placé dans un sac plastique hermétiquement clos pendant une semaine (photo n°7). La semaine suivante, le sac sera alternativement ouvert et fermé, puis retiré la troisième semaine.

Le porte-greffe sera coupé 4 cms environ au dessus du point de greffe au bout d'un mois. Sur la photo n°8, l'on aperçoit bien le greffon (g), le premier porte-greffe (pg1), le second porte greffe (pg2) et le point de taille de ce dernier (c).

Lorsque la reprise est confirmée, il faut s'assurer de l'éradication du virus. L'IVIA utilise pour cela des plantes indicatrices, c'est à dire très sensible aux virus à éliminer. Pour le virus de la Tristeza, c'est la lime mexicaine qui fait office de plant indicatrice.



Photo n°9 :
Innoculation. Greffe de tige de la plante à tester sur plante indicatrice.

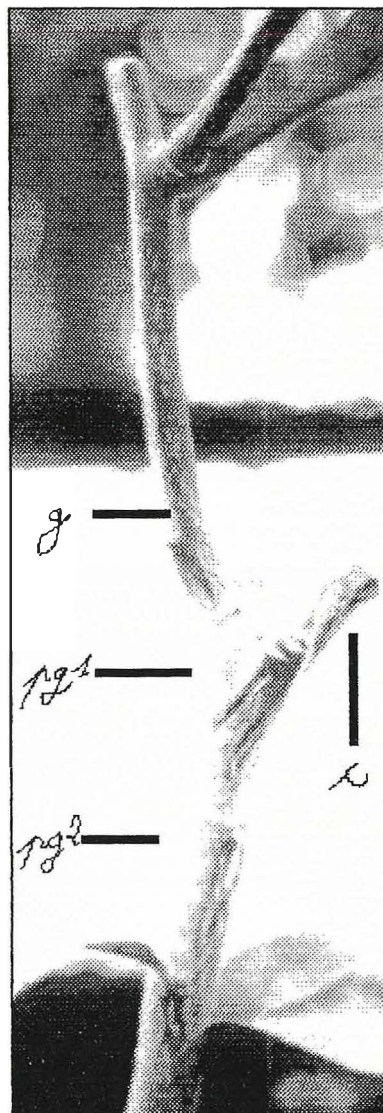


Photo n°8: Plant en serre comprenant 1er et 2ème porte greffe et le greffon

La technique d'indexation consiste à greffer sur la plante indicatrice, des morceaux de tige de la plante à tester (photo n°9). Une observation visuelle permettra de détecter l'apparition ou non des symptômes de la maladie. Cette technique présente l'avantage d'être simple, pratique et peu couteuse. Cependant, en cas de doute un test de type ELISA pourra être effectué pour vérification.

III - Utilisation de la technique et schéma directeur

Après avoir beaucoup utilisé cette technique pour régénérer toutes les variétés d'agrumes infectés, l'IVIA n'a recourt, à présent, à cette technique que dans le cas d'apparition par mutation de nouvelles variétés.

La technique y est bien maîtrisée et toute l'infrastructure nécessaire est disponible:

- laboratoire de culture in vitro
- serre de multiplication des porte-greffe et des plantes indicatrices
- serre froide pour le maintien de la collection de germplasm (plantes saines).
- serre froide pour le maintien de la collection des plantes virosées (pour inoculation)

La pratique du microgreffage ne se limite donc pas à la seule phase in vitro. en effet pour chaque microgreffe réalisée in vitro, il faut un porte greffe en serre d'une taille donnée (pour pouvoir être courbée) et une plante indicatrice pour le test.

Schéma directeur:

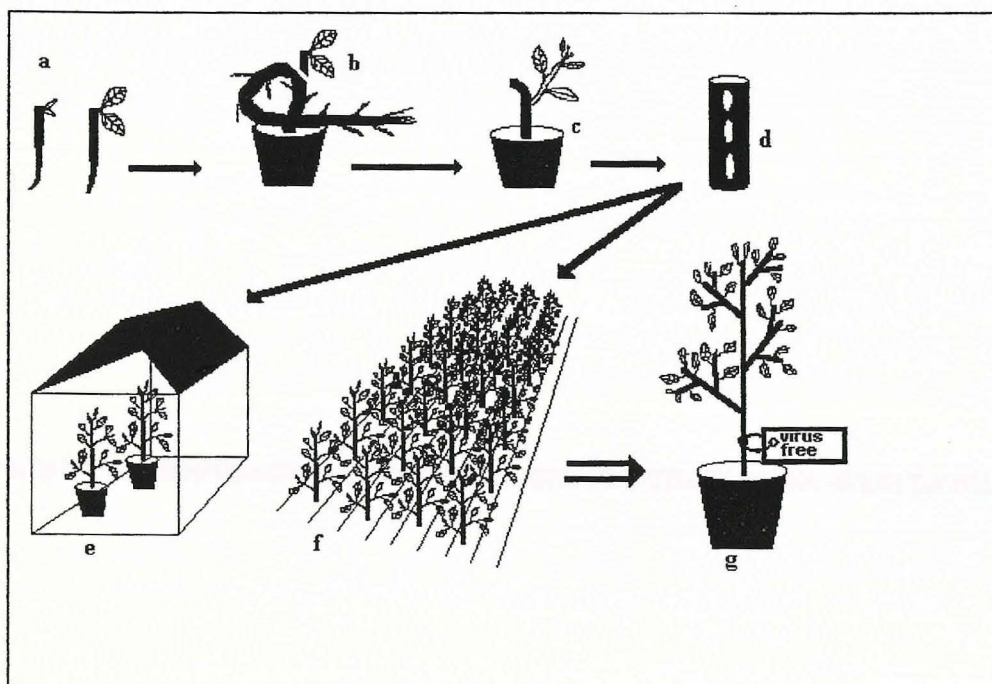


Schéma n°10: Schéma de l'utilisation du microgreffage à l'IVIA. a = microgreffage in vitro. b = second greffage en serre. c = production de rameaux. d = indexation sur plante indicatrice. e = conservation de deux plantes par variétés saines. f = champ de multiplication. g = fourniture de matériel sain aux agrumiculteurs.

Bibliographie sommaire

Navarro L (1981) Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications: a review. Proc Int Soc Citricult 1:452-456

Nicoli M (1985) La régénération des agrumes en Corse par la technique du microgreffage des méristèmes in vitro. Fruits 40: 113-136

Navarro L (1992) Citrus shoot-tip grafting in vitro. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 18. High-Tech and Micropropagation II (ed. by Y.P.S. Bajaj)